

Reindarstellung der Glucosidasen N-acetyl- β -Glucosaminidase und α -Mannosidase
zur Aufklärung der Polysaccharidstruktur am Inter-alpha-Trypsininhibitor

Bernd R. Wollny

Aus dem Biochemischen Laboratorium (Leitung: Prof. Dr. K. Hochstraßer)
der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Kastenbauer
(Beginn der Arbeit unter der Direktion von Prof. Dr. H. H. Naumann)

Reindarstellung der Glucosidasen N-acetyl- β -Glucosaminidase und α -Mannosidase
zur Aufklärung der Polysaccharidstruktur am Inter-alpha-Trypsininhibitor

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bernd R. Wollny

aus
München

1986

Berichterstatter: Prof.Dr.Dr.K.Hochstraßer

Mitberichterstatter: Prof.Dr.E.R.Kastenbauer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr.rer.nat.Öyvind Schönberger

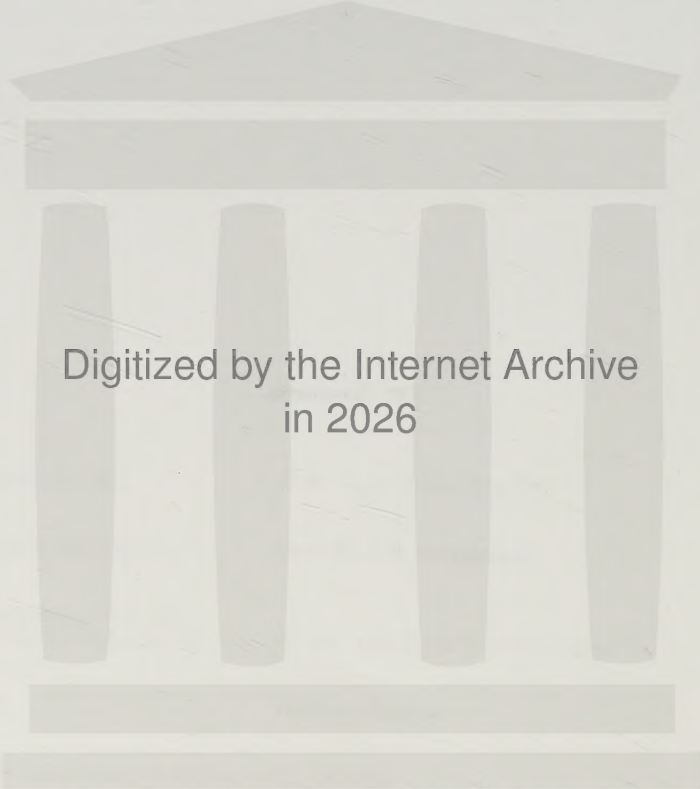
Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.10.1986

Inhaltsverzeichnis

Nr.	Titel	Seite
1	Einleitung	1
2	1. Kapitel	2
3	2. Kapitel	3
4	3. Kapitel	4
5	4. Kapitel	5
6	5. Kapitel	6
7	6. Kapitel	7
8	7. Kapitel	8
9	8. Kapitel	9
10	9. Kapitel	10
11	10. Kapitel	11
12	11. Kapitel	12
13	12. Kapitel	13
14	13. Kapitel	14
15	14. Kapitel	15
16	15. Kapitel	16
17	16. Kapitel	17
18	17. Kapitel	18
19	18. Kapitel	19
20	19. Kapitel	20
21	20. Kapitel	21
22	21. Kapitel	22
23	22. Kapitel	23
24	23. Kapitel	24
25	24. Kapitel	25
26	25. Kapitel	26
27	26. Kapitel	27
28	27. Kapitel	28
29	28. Kapitel	29
30	29. Kapitel	30
31	30. Kapitel	31
32	31. Kapitel	32
33	32. Kapitel	33
34	33. Kapitel	34
35	34. Kapitel	35
36	35. Kapitel	36
37	36. Kapitel	37
38	37. Kapitel	38
39	38. Kapitel	39
40	39. Kapitel	40
41	40. Kapitel	41
42	41. Kapitel	42
43	42. Kapitel	43
44	43. Kapitel	44
45	44. Kapitel	45
46	45. Kapitel	46
47	46. Kapitel	47
48	47. Kapitel	48
49	48. Kapitel	49
50	49. Kapitel	50
51	50. Kapitel	51
52	51. Kapitel	52
53	52. Kapitel	53
54	53. Kapitel	54
55	54. Kapitel	55
56	55. Kapitel	56
57	56. Kapitel	57
58	57. Kapitel	58
59	58. Kapitel	59
60	59. Kapitel	60
61	60. Kapitel	61
62	61. Kapitel	62
63	62. Kapitel	63
64	63. Kapitel	64
65	64. Kapitel	65
66	65. Kapitel	66
67	66. Kapitel	67
68	67. Kapitel	68
69	68. Kapitel	69
70	69. Kapitel	70
71	70. Kapitel	71
72	71. Kapitel	72
73	72. Kapitel	73
74	73. Kapitel	74
75	74. Kapitel	75
76	75. Kapitel	76
77	76. Kapitel	77
78	77. Kapitel	78
79	78. Kapitel	79
80	79. Kapitel	80
81	80. Kapitel	81
82	81. Kapitel	82
83	82. Kapitel	83
84	83. Kapitel	84
85	84. Kapitel	85
86	85. Kapitel	86
87	86. Kapitel	87
88	87. Kapitel	88
89	88. Kapitel	89
90	89. Kapitel	90
91	90. Kapitel	91
92	91. Kapitel	92
93	92. Kapitel	93
94	93. Kapitel	94
95	94. Kapitel	95
96	95. Kapitel	96
97	96. Kapitel	97
98	97. Kapitel	98
99	98. Kapitel	99
100	99. Kapitel	100

Für Annamaria



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0021

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
2. Allgemeiner Teil
 - 2.1. Proteinase Inhibitoren
 - 2.2. Polysaccharidstrukturen
 - 2.2.1. Die einzelnen Monosaccharide
 - 2.2.2. Strukturen von Polysacchariden
 - 2.2.3. Bindung zwischen Polysacchariden und Protein
 - 2.2.4. Glykosidasen
3. Spezieller Teil
 - 3.1. Inter- α -Trypsin Inhibitor (ITI)
 - 3.2. Kohlenhydratanteil des HI-30
4. Ergebnisse
 - 4.1. Isolierung von Glykosidasen
 - 4.1.1. Herstellung des Rohextraktes
 - 4.1.2. Beschreibung des enzymatischen Tests und Berechnung der Enzymaktivität
 - 4.1.3. Ausfällung der Glykosidasen
5. Chromatographische Verfahren zur Reinigung der Glykosidasen
 - 5.1. Concanavalin A-Sephrose
 - 5.2. Chromatographie an DEAE - Sephadex
 - 5.3. Chromatographie an CM-Sephadex
 - 5.4. Chromatographie an dem Molekularsieb G-100
 - 5.5. Zusammenfassung der Reinigungsschritte
6. Untersuchungen mit dem Zuckeranalysator

- 6.1. Prinzip der Methode
- 6.2. Analyse des Glykopeptids
 - 6.2.1. Isolierung des Glykopeptids
 - 6.2.2. Polysaccharidanteil des Glykopeptids
- 6.3. Versuche zur Ermittlung der Monosaccharidstruktur des Glykopeptids
 - 6.3.1. Abspaltung der Sialinsäure
 - 6.3.2. Umsetzung des Asialopeptids mit N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase
- 7. Zusammenfassung
- 8. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

Eine Vielzahl der bekannten Proteine besitzen Polysaccharidseitenketten und sind somit Glykoproteine. Im menschlichen Plasma ist ein großer Teil der Proteine glykosiliert. So z. B. die Immunglobuline Ig G, Ig A, Ig M, Ig D und Ig E, Bestandteile des Komplement Systems wie C 1 q und Proteine des Blutgerinnungssystems, darunter Prothrombin, Plasminogen und Fibrinogen. Eine größere Liste der Glykoproteine im menschlichen Plasma findet sich in den von Putnam herausgegebenen Bänden über Plasma Proteine (1). Der bekannteste Vertreter der nicht-glykosilierten humanen Plasmaproteine ist das Albumin (2).

Die Funktion des Polysaccharidanteils von Proteinen ist noch weitgehend ungeklärt. Bekannt ist, daß intakte Polysaccharidstrukturen für die Lebensdauer von Proteinen im Blutkreislauf wichtig sind (3 - 8). Glykoproteine, die N-Acetylneuraminsäure, ein immer endständig stehender Zucker, verloren haben, werden schnell eliminiert und normalerweise von Leberzellen aufgenommen und phagozytiert (4).

Weiterhin zeigen Versuche, daß Glykoproteine schlechter von Proteasen abgebaut werden als Proteine ohne Polysaccharidseitenketten (9 - 12). Inwieweit diese Tatsache von physiologischer Bedeutung ist, bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Trotz der in den letzten Jahren sehr raschen Entwicklung der Sequenzierung von Desoxyribonucleotidketten, kann die Sequenz der Nukleotidbasen nur Auskünfte über den Proteinanteil, aber nicht über Modifizierungen des Proteins (= Processing) wie Quervernetzungen durch Disulfidbrücken, Phosphorylierung oder Glykosilierung geben.

Zur Aufklärung des Polysaccharidanteils von Proteinen sind neben chemischen Techniken (13-14a-16) biochemische Methoden mit Hilfe von Glykosidasen gebräuchlich (17 - 19).

2. Allgemeiner Teil

2.1. Proteinase Inhibitoren

Wie bereits erwähnt, besitzen die meisten Proteine des menschlichen Plasmas Polysaccharidketten. Dazu gehört auch eine wichtige Klasse, nämlich die Proteinase Inhibitoren. In der Tabelle 1 sind die bisher bekannten menschlichen Plasma Proteinase Inhibitoren zusammengefaßt. Außerdem ist mit aufgelistet, ob die Aminosäuresequenz, die cDNA Sequenz, die Zusammensetzung des Polysaccharidanteils und die Polysaccharidstruktur bekannt sind.

Die physiologische Bedeutung dieser Inhibitoren ist für einige gut dokumentiert, während für andere einige Spekulationen bestehen, aber der eindeutige Beweis noch ausgeblieben ist.

α_1 -Proteinase Inhibitor, der früher mit dem Namen α_1 -Antitrypsin als Hauptfunktion Trypsinhemmung suggerierte, wird als Gegenspieler der Leukozyten Elastase angesehen (37 - 38). α_1 -PI kann jedoch viele Proteinasen hemmen (39). Oxidation des Methionins im reaktiven Zentrum des Inhibitors führt zu dessen Inaktivierung (40).

α_1 -Proteinase Inhibitor verliert die Eigenschaft, Leukozyten Elastase teilweise zu hemmen (40a), aber nicht die Fähigkeit, die Aktivität von Pankreas-Trypsin zu stoppen (41).

Der Verlust der Eigenschaft Leukozyten Elastase zu hemmen, hat jedoch offensichtlich pathologische Relevanz. Gewebe ist dann nämlich ungeschützt einer Verdauung durch die Elastase ausgesetzt. Besonders gefährdet ist dabei der Respirationstrakt (42 - 45). Ein genetisch erblicher Mangel an α_1 -Proteinaseinhibitor, bei dem nur 10 - 15 % des

Tabelle 1: Proteinase Inhibitoren des menschlichen Plasmas

	Normalwerte mg/100 ml (a)	Aminosäuresequenz
α_1 -Proteinase Inhibitor	200-400	aufgeklärt (22)
α_1 -Antichymotrypsin	30- 60	N- und C-Terminus (26)
Antithrombin III	22- 39	fast vollständig (27)
C1-Inaktivator	15- 35	unbekannt
α_2 -Antiplasmin	6	unbekannt
Inter- α -Trypsin Inhibitor	20-70	teilweise (29, 30, 31)
α_2 -Makroglobulin	150-420	fast vollständig (33)
β_1 -Antikollagenase	?	unbekannt
α_2 -Cystein Proteinase Inhibitor	50	aufgeklärt (35)

a. entnommen aus (20) und (21)

b. entnommen aus (21)

cDNA-Sequenz	Zuckeranteil (b)	Zuckerstruktur
aufgeklärt (23)	12 %	aufgeklärt (24, 25)
unbekannt	26 %	unbekannt
aufgeklärt (28)	15 %	unbekannt
unbekannt	35 %	unbekannt
unbekannt	11 %	unbekannt
unbekannt	8,4 %	teilweise ist die Zusammensetzung bekannt (32)
aufgeklärt (34)	8-11 %	unbekannt
unbekannt	Spuren	unbekannt
aufgeklärt (36)		

normalen Wertes im Serum erreicht werden, ist mit zwei Erkrankungen korreliert: Lungenemphysem und Leberzirrhose im jugendlichen Alter (39 - 46 - 47). Aufgrund dieser Bedeutung von α_1 -Proteinaseinhibitor sind Untersuchungen im Gange, den Inhibitor gentechnologisch herzustellen bzw. nicht oxidierbare Leukozyten Elastase Hemmer zu untersuchen (48 - 49).

α_1 -Antichymotrypsin ist ein akutes Phasenprotein (50). Seine Hauptaufgabe dürfte ebenfalls die Hemmung eines Leukozyten Enzyms sein. Kathepsin G, eine chymotrypsinähnliche Protease, kann alleine oder zusammen mit der Elastase gewebezzerstörend wirken.

Antithrombin III hat seinen Namen zu recht. Er ist der Hauptinhibitor für Thrombin, hemmt aber außerdem noch Plasmin, Faktor X a und Trypsin. Die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Antithrombin III und Thrombin ist langsam, wird jedoch durch Heparin sehr stark beschleunigt. Als Inhibitor für Thrombin und Plasmin hat Antithrombin III seine Bedeutung für die Blutgerinnung (51 - 54) und wird deswegen in der klinischen Diagnostik nicht unbeachtet gelassen. Genetisch bedingter Antithrombin-III-Mangel kann der Grund von Thrombophilien sein (55 - 57).

C1 Inaktivator hemmt die C1 Esterase des Komplementsystems, Plasmin Chymotrypsin, Kallikrein und den aktivierten Hageman Faktor und ist somit in das Gerinnungssystem, in das fibrinolytische System und in die Kinin Bildung involviert (58). Genetischer Mangel von C1 Inaktivator geht einher mit dem angioneurotischen Syndrom (59).

α_2 -Antiplasmin ist der effektivste und schnellste Inhibitor für Plasmin (60 - 61). Die Hemmung von anderen Proteasen, z. B. Thrombin und Plasma Kallikrein (62 - 63) ver-

läuft so langsam, daß diese Enzyme sicher nicht die Zielenzyme für α_2 -Antiplasmin sind. Für α_2 -Antiplasmin wurde bisher keine eindeutige Evidence für seine physiologische Rolle gefunden. Interessant ist die Hypothese von Travis (21), daß α_2 -Antiplasmin unterscheiden kann zwischen Plasmin, das ein Gerinnsel auflösen kann und Plasmin, das im Blutstrom unnötigerweise schwimmt. Einige Ergebnisse, die von Travis zitiert werden, liefern für diese Annahme mögliche Hinweise.

Über den Inter- α -Trypsininhibitor soll, da er ein Bestandteil der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Arbeiten ist, später genauer eingegangen werden.

α_2 -Makroglobulin ist ein Proteinase Inhibitor, der sich aufgrund des Hemmechanismus und aufgrund der Tatsache, daß er jede Proteinase hemmen kann, von den anderen Plasmainhibitoren unterscheidet. In der sogenannten Fallen-Hypothese (trap hypothesis), entwickelt und bewiesen von Barrett & Starkey (64 - 65), spaltet die Protease eine Bindung, was zur Folge hat, daß die "Falle" zuschlägt und die Proteinase wie in einem Käfig gefangen ist. Kleinere Substrate kann die so eingeschlossene Proteinase noch spalten (65), aber größere können nicht mehr (durch die "Gitterstäbe") zur Protease diffundieren.

Die physiologische Rolle von α_2 -Makroglobulin ist unklar. Trotz intensiver Suche konnte bisher kein Serum mit Mangel an α_2 -Makroglobulin entdeckt werden (66).

β_1 -Antikollagenase wurde aus menschlichem Serum gereinigt und charakterisiert (67). Dieser Inhibitor kann die leukozytäre Kollagenase hemmen, worin seine physiologische Bedeutung liegen dürfte. Als Hemmechanismus wurde ein Disulfidaustausch vorgeschlagen (68), wobei Myeloperoxidase Einfluß über Oxidations- bzw. Reduktionsmechanismen auf die Steuerung des Kollagenase/Antikollagenase-Systems hat (67).

In der **Tabelle I** ist von den Cysteinproteinase Inhibitoren des Plasmas nur der α_2 -Cystein Proteinase Inhibitor aufgeführt. Es wurden weitere gefunden, die sich u.a. in der elektrophoretischen Beweglichkeit und im Molekulargewicht vom ersten unterscheiden, α_1 -Cystein Proteinase Inhibitor, low-molecular weight, Cysteine Proteinase Inhibitor (69 - 71). Die Bedeutung der Inhibitoren für Cysteinproteinasen dürfte hauptsächlich in der Tatsache zu suchen sein, daß sie Kathepsin B hemmen (72 - 73), einer Protease, die bei Tumoren erhöht vorkommt (74).

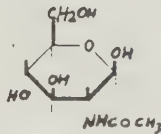
Kürzlich zeigte sich, daß α -Cystein Proteinase Inhibitoren Teile der Kininogene sind (75 - 77).

2.2. Polysaccharidstrukturen

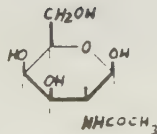
2.2.1. Die einzelnen Monosaccharide

Die Polysaccharide, die in Glykoproteinen gefunden werden, sind auf wenige begrenzt. Jedoch durch die vielen Möglichkeiten, die einzelnen Monosaccharide zu verknüpfen, ergeben sich komplizierte Strukturen. Zunächst sollen die einzelnen Monosaccharide vorgestellt werden.

a. N-Acetylglucosamin



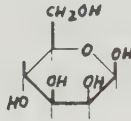
b. N-Acetylgalaktosamin



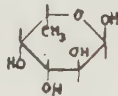
Die beiden Aminosucker Galaktosamin und Glucosamin sind meistens acetyliert. Glukose und Galaktose, die Stammverbindungen, kommen in Glykoproteinen selten vor. Strukturell ähnlich zu Glukose und Galaktose ist die Mannose, die jedoch nicht als Aminosucker, sondern als Stammverbindung in Glykoproteinen zu finden ist. Bei der Biosynthese von Polysaccharidketten kommt der Mannose eine wichtige Rolle zu, was später noch ausführlicher behandelt werden soll.

Mannose hat folgende Struktur:

c. Mannose

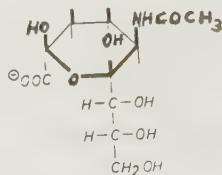


d. Fucose (6-Desoxy-L-galaktose)



Die oben abgebildete Fucose unterscheidet sich von den bereits vorgestellten Monosacchariden. Anstatt einen D-Zucker zu bilden, ist die Fucose ein L-Zucker. Die Grundstruktur der N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure ist ein anderer Name für diesen Zucker) ist ein Sechsring, aber im Gegensatz zu den bereits erwähnten Monosacchariden, zweigt vom Sechsring eine Seitenkette mit drei Kohlenstoffatomen ab. N-Acetylneuraminsäure hat folgende Struktur:

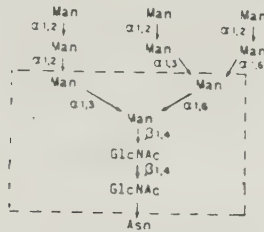
e. N-Acetylneuraminsäure



2.2.2. Strukturen von Polysaccharidketten in Glykoproteinen

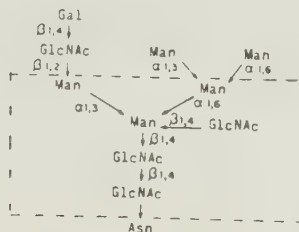
Die Strukturen von Polysaccharidketten in Glykoproteinen lassen sich in drei Klassen einteilen. Dies gilt aber nur, wenn diese Polysaccharidketten N-glykosidisch an Asparagin (siehe unten) gekoppelt sind. Allen drei Klassen ist gemeinsam, daß sie mit GlcNAc-GlcNAc-Man beginnen. An dieser Mannose hängen verzweigt zwei weitere Mannose-Reste.

a. High-Mannose Typ



Neben den bereits erwähnten Polysacchariden enthält diese Einheit nur noch Mannose. Ist der Mannose-Anteil reduziert, kommt man zum

b. Hybrid-Typ



3. Spezieller Teil

3.1. Inter- α -Trypsin Inhibitor (ITI)

Der ITI erhielt seinen Namen aufgrund seiner Eigenschaften: er hemmt die Serinprotease Trypsin und wandert in der Zelluloseacetat-Elektrophorese bis in den Bereich zwischen α_1 und α_2 (80). Von seinem relativ großen Molekulargewicht von 180 000 Da ist nur ein Teil mit einem Molekulargewicht von 30 000 Da für die inhibitorische Aktivität verantwortlich (81). Dieser reaktive Teil wird proteolytisch freigesetzt (82) und läßt sich im Plasma und im Urin nachweisen (81). Er besteht aus 144 Aminosäuren, die in zwei sogenannten Kunitz-Typ Domänen und einem 21 Aminosäurereste langen Glykopeptid angeordnet sind (83 - 86). Der gesamte Inhibitor wird HI-30 genannt. Werden die ersten 21 Aminosäuren entfernt (z. B. mit Trypsin) erhält man HI-14 (Abb. 1). Jede einzelne Domäne kann unabhängig von der anderen ihre Hemmaktivität entfalten. Die Aminosäuresequenz wurde nicht nur vom menschlichen Inhibitor, sondern auch von anderen Spezies wie Rind, Pferd und Schwein teilweise bzw. vollständig aufgeklärt (Abb. 2, 87 - 88). Ihre Hemmspezifität ist nicht gleich. Alle hemmen zwar mit der 2. Domäne Trypsin, aber die Spezifität der ersten Domäne unterscheidet sich etwas von Spezies zu Spezies (88). Dies ist in der Aminosäuresequenz der reaktiven Region begründet. Die sogenannte P 1 Position spielt dabei die Hauptrolle.

Vom menschlichen Inhibitor ist außerdem die Zusammensetzung der Polysaccharidseitenketten aber nicht die Abfolge der einzelnen Monosaccharidbausteine bekannt (32). Vor kurzem wurde gezeigt, daß der ITI mit den beiden Kunitz-Typ Domänen beginnt (89 - 90). Sie stellen somit den N-terminalen Teil des Inhibitors dar.

Ein-Buchstaben-Abkürzungen der Aminosäuren

A	=	Ala	=	Alanin
C	=	Cys	=	Cystein
D	=	Asp	=	Asparaginsäure
E	=	Glu	=	Glutaminsäure
F	=	Phe	=	Phenylalanin
G	=	Gly	=	Glycin
H	=	His	=	Histidin
I	=	Ile	=	Isoleucin
K	=	Lys	=	Lysin
L	=	Leu	=	Leucin
M	=	Met	=	Methionin
N	=	Asn	=	Asparagin
P	=	Pro	=	Prolin
Q	=	Gln	=	Glutamin
R	=	Arg	=	Arginin
S	=	Ser	=	Serin
T	=	Thr	=	Threonin
V	=	Val	=	Valin
Y	=	Tyr	=	Tyrosin
W	=	Trp	=	Tryptophan

Domain I

BI-14 1 KADSCQLDYSOGPCGLGFKRYFYNGTSMACETFLYGGCGMGNLNNFLSQKECLQTCT 56
 HI-14 -E-----GYSA--M-MTS-----T-----Q-----M-G--VT-----
 EI-14 -E-----DHAQ---L-MIS-----T-----Q---L-G--AS-----
 PI-14 -E-----GYSQ---L-MIK-----S-----H---M-G--VS-----

Domain II

BI-14 57 60 80 100 120 123
 TVEACNLPIVQGPCRAFIQLWAFDAVRGKCVRFSGYGGCKGNKNKFSQKECKEYCGIGGEADELLR
 HI-14 --A--N--VIR-----Q-----VK---L-P---Q-----R---V--DE-----
 EI-14 --A--N--IVQ-----R-----AQ---L-T---R-----K---I--DG-----
 PI-14 --S--S--IVQ-----R-----AQ---L-N---Q-----K---V--EE-----

Abbildung 2: Aminosäuresequenz der beiden Kunitz-Typ

Domänen des hemmaktiven Teils des ITI s.

BI : Rinderinhibitor

HI : Humaninhibitor

EI : Pferdeinhibitor

PI : Schweineinhibitor

Obwohl die physiologische Bedeutung des ITI's noch unbekannt ist, deuten eine Vielzahl von Studien auf eine wichtige Funktion hin. So wurde im Urin von Patienten mit Tumoren im HNO-Bereich erhöhte Spiegel von Inhibitor (HI-30, d.h. mit Molekulargewicht 30 000) im Urin gefunden (91). In einer anderen Studie wurde gezeigt, daß bei einer Vielzahl von Tumoren erhöhte Mengen HI-30 ausgeschieden werden (92). Diese Befunde deuten darauf hin, daß durch erhöhte proteolytische Aktivitäten während des Tumorwachstums mehr ITI umgesetzt wird und deswegen mehr HI-30 im Urin erscheint. Es ist allgemein anerkannt, daß während der Tumordinvasion Proteasen eine Rolle spielen dürften (93 - 94). Die erzielten Ergebnisse der HI-30 Untersuchungen im Urin passen gut zu dieser Vorstellung.

Als diagnostischer Parameter für den Erfolg von Nierentransplantationen scheint sich die Bestimmung von HI-30 bzw. ITI zu eignen. Eine Abstoßungskrise konnte frühzeitig durch den Anstieg der Inhibitoren im Serum erkannt werden (95).

Trotz der relativ einfachen Bestimmungsmethode der Inhibitoren ist die Messung von ITI und HI-30 jedoch noch nicht weit verbreitet, so daß eine eindeutige Korrelation zwischen ITI/HI-30 und verschiedenen Krankheitsbildern noch nicht möglich ist.

3.2 Kohlenhydratanteil des HI-30

Wie bereits erwähnt, ist der HI-30 ein Glykoprotein (32, Abb. 1). Bisher ist nur die Zusammensetzung der Polysaccharidketten bekannt (32) und an welche Aminosäuren sie gebunden sind, aber nicht die Sequenz der Monosaccharide.

Eine Aufklärung der Polysaccharidstruktur ist nicht nur wünschenswert, um eine vollständige Beschreibung des HI-30's zu erhalten, sondern auch um weitere Hinweise auf die physiologische Funktion des Inhibitors zu bekommen. Es gilt zu beantworten:

- a) Steht die Höhe des Polysaccharidanteiles in Zusammenhang mit dem Transport des Inhibitors vom Synthese- zum Wirkungsort?
- b) Ist die gesamte Polysaccharidstruktur nötig, oder kann eine Polysaccharidkette auch etwas "beschädigt" sein, ohne die Funktion des Inhibitors zu beeinträchtigen?
- c) Besteht eine Abhängigkeit zwischen der Bindung des Inhibitors an Rezeptoren und der Polysaccharidstruktur?

Um Hinweise auf die Struktur der Polysaccharidketten zu erhalten, war es Ziel dieser Arbeit, Glykosidasen zu reinigen und diese zur Aufklärung des Zuckeranteils von HI-30 einzusetzen.

4. Ergebnisse

4.1. Isolierung von Glykosidasen

Als Ausgangsprodukt für die Reinigung von Glykosidasen dienten gemahlene Bohnen der tropischen Pflanze *Concanavalia ensiformis*. Der amerikanische Name ist Jack beans.

4.1.1. Herstellung des Rohextrakts

100 g des Mehls wurden in 600 ml destilliertem Wasser suspendiert, 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend stehengelassen, bis sich der meiste Teil der Feststoffe abgesetzt hatte. Der noch trübe Überstand wurde vorsichtig dekantiert, mit 1,5 M Natrium-Citrat-Lösung, pH 2,7 auf pH 5,5 eingestellt und zentrifugiert. Es wird ein klarer gelblicher Rohextrakt erhalten. In diesem Extrakt konnten 7 Glykosidasen mit unterschiedlichen Aktivitäten nachgewiesen werden. In der Tabelle II sind die Enzyme zusammengestellt, die spezifischen Substraten nachgewiesen werden konnten. Die gefundenen Aktivitäten der jeweiligen Enzyme im gesamten Extrakt sind ebenfalls aufgelistet. Es muß darauf hingewiesen werden, daß die Spaltung der Substrate nur einen Hinweis auf das vermutete Enzym geben kann. Um welches Enzym es sich handelt, kann erst nach vollständiger Reinigung und biochemischer Charakterisierung angegeben werden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in allen Tabellen das wahrscheinlichste Enzym angeführt.

Die Aktivität ist in milli Units angegeben. Eine Unit ist definiert als die Enzymmenge, die in einer Minute 1 Mikromol Substrat bei einer bestimmten Temperatur in einem definierten Puffer umsetzt. Als Substrate dienten Polysaccharide, die mit Nitrophenol derivatisiert sind. Die Glykosidasen setzten das Nitrophenol aus dem Derivat frei. Bei 405 nm kann der Umsatz quantitativ gemessen werden. Die Enzymaktivität wird in milli Units (mU) angegeben.

Gefundene Enzymaktivitäten im Rohextrakt

Tabelle II

Substrat	Aktivität	Enzym
4-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid	12.000 mU	α -D-Glucosidase
4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid	4.000 mU	β -D-Glucosidase
4-Nitrophenyl- α -D-galactopyranosid	55.000 mU	α -D-Galactosidase
4-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid	7.000 mU	β -D-Galactosidase
4-Nitrophenyl- α -L-fucopyranosid	2.500 mU	α -L-Fucosidase
4-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid	108.000 mU	N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase
4-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid	168.000 mU	α -Mannosidase

Es wurden 350 ml Rohextrakt erhalten. Dies ist bei den Angaben in der Tabelle II berücksichtigt. Außerdem wurde in der Tabelle nicht spezifiziert, ob es sich bei der N-Acetyl- β -D-hexosaminidase um N-Acetyl- β -D-glucosaminidase oder um N-Acetyl- β -D-galactosaminidase handelt. Die Spezifität dieser Glykosidase ist nicht so ausgeprägt wie die der anderen monosaccharidabspaltenden Enzyme. Deswegen ist es nicht nötig zu unterscheiden, sondern es genügt, von N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase zu sprechen. Wie es sich aus den Aktivitätswerten in der Tabelle II ersehen läßt, sind α -Mannosidase, N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase, α -D-Glucosidase und α -D-Galactosidase die vier Hauptenzyme des Rohextrakts. Die Polysaccharidanalyse des HI-30 (32) hatte gezeigt, daß diese Enzyme für eine vollständige Polysaccharidstrukturermittlung genügen könnten. Deswegen wurde das Hauptaugenmerk auf deren Isolierung gelegt.

4.1.2. Beschreibung des enzymatischen Tests und Berechnung der Enzymaktivität

Die Aktivität der Glykosidasen wurde folgendermaßen gemessen:

Die in der Tabelle II aufgeführten Substrate wurden in 0,05 M Citrat-Puffer pH 4,5 gelöst. Die Konzentration der Substratlösungen betrug in jedem Falle 2 mM.

1 ml dieser Substratlösungen wurde mit 50 μ l Enzymlösung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Enzymreaktion wurde dann mit 3 ml 0,2 M Natriumborat-Puffer, pH 9,8, gestoppt. Der Absorptionsunterschied gegen einen entsprechend behandelten Ansatz, jedoch ohne Enzymlösung, wurde bei 405 nm in einem Eppendorf-Photometer gemessen und daraus die Aktivität in mU berechnet.

Die Definition für milli Units lautet folgendermaßen:

1 mU Enzymaktivität bedeutet den Umsatz von 1 nMol Substrat. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz läßt sich nun berechnen, welcher Absorptionsänderung dies entspricht.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

$$c = 1 \times 10^{-9} \text{ Mol} / 4 \times 10^{-3} \text{ l}$$

(nach Ende der Reaktion betrug das
Testvolumen 4 ml)

$$\epsilon = 17700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ l}$$

Damit errechnet sich für 1 mU ein A von

$$\begin{aligned} A &= 17700 \times 1 \times 0,25 \times 10^{-6} \\ &= 0,004425 \text{ Skalenteile/min.} \end{aligned}$$

Das heißt, die gemessenen Skalenteile/min müssen mit 1/0,004425 multipliziert werden, um die mU zu erhalten. Da jedoch 30 min inkubiert wurde und da 50 μ l Enzymlösung eingesetzt worden waren, müssen die gemessenen Skalenteile/min mit 1/0,004425 $\times$ 20/30 = 150 multipliziert werden, um die Enzymaktivität in mU/ml zu erhalten.

4.1.3. Ausfällung der Glykosidasen

Zur weiteren Reinigung der Glykosidasen wurde der Rohextrakt einer fraktionierten Fällung unterworfen. Diese bestand aus zwei Ammoniumsulfatfällungen und zwei Ätha-

nolfällungen. Der wäßrige Rohextrakt wurde mit festem Ammoniumsulfat versetzt, bis eine Konzentration von 8,3 % (w/v) an Ammoniumsulfat erreicht wurde. Das gebildete Präzipitat wurde abzentrifugiert, in Wasser gelöst und die Aktivität der 7 Glykosidasen gemessen (Tabelle III).

Der Überstand wurde wieder mit Ammoniumsulfat versetzt, so daß die Ammoniumsulfatkonzentration von 8,3 % auf 20 % gesteigert wurde. Dabei bildete sich wieder ein Niederschlag, mit dem genauso verfahren wurde wie oben. Die erhaltenen Enzymaktivitäten sind ebenfalls in der Tabelle III aufgelistet.

An diese zwei Ammoniumsulfatfällungen schlossen sich zwei Äthanolfällungen an. Zunächst wurde der Überstand der letzten Ammoniumsulfatfällung mit Äthanol bis zu einer Konzentration von 7 % versetzt. Nach Abzentrifugieren wurde zum Überstand wieder Äthanol dazugegeben, bis die Lösung 12 %ig war. Die beiden Niederschläge, die bei den Äthanolfällungen erhalten wurden, sind in Wasser aufgelöst worden und anschließend wurden in den erhaltenen Lösungen die Glykosidase-Aktivitäten gemessen. Auch diese Werte sind in der Tabelle III aufgeschlüsselt.

Das Ziel der fraktionierten Fällung des Rohextraktes war eine klare Trennung von einzelnen Glykosidasen zu erhalten. Wie aber die Aktivitätsmessungen der 7 Enzyme zeigten (Tabelle III), wurden zwar Anreicherungen einzelner Glykosidasen in den einzelnen Fällungsfractionen erhalten, aber es wurde nicht erreicht, daß eine Fällungsfraction nur ein oder zwei Enzyme enthielt.

Zur weiteren Reinigung wurde jeweils die aktivste Fraction genommen. Außerdem wurde bei einer neuen Präparation auf die fraktionierte Fällung verzichtet. Es wurde stattdessen nur einmal mit Ammoniumsulfat ausgefällt. Die Konzentration wurde auf 40 % erhöht. Zwischen 60 und 70 % der Enzymaktivitäten wurden auf diese Weise wiedererhalten.

Ausbeute der Aktivitäten während der Reinigung

Tabelle III

Enzym	Rohextrakt	1. Ammoniumsulfat-fällung	2. Ammoniumsulfat-fällung	1. Äthanol-fällung	2. Äthanol-fällung	letzter Überstand
α -D-Glucosidase	12.000	1.000	2.400	850	1.400	300
β -D-Glucosidase	4.000	200	1.000	70	220	870
α -D-Galactosidase	55.000	1.700	27.000	900	1.000	15.000
β -D-Galactosidase	7.000	200	4.700	250	280	5.300
α -L-Fucosidase	2.500	150	140	100	180	700
N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase	108.000	4.000	91.000	7.000	9.700	73.000
α -D-Mannosidase	168.000	27.500	88.500	30.500	45.000	95.000

5. Chromatographische Verfahren zur Reinigung der Glykosidasen

5.1. Concanavalin A-Sepharose

Concanavalin A (Con A) ist ein Lectin das spezifische Strukturen mit Glukose oder Mannose erkennt und bindet. Kovalent an Sepharose gekoppelt, wird Con A vielfältig für die Isolierung verschiedenster Substanzen eingesetzt, hauptsächlich zur Reinigung von Glykoproteinen (96) und Glykopeptiden (32)

Der Reinigungsschritt mit Con A-Sepharose erwies sich auch hilfreich für die Isolierung von Glykosidasen.

Die enzymreichste Fraktion der Fällungsversuche bzw. die nach einmaliger Ammoniumsulfatfällung (40 %) erhaltene konzentrierte Enzymlösung wurde gegen den Startpuffer der Con A Chromatographie (0,05 M Na-Citrat, pH 4,5) über Nacht dialysiert. Anschließend wurde die so in den Startpuffer über-führte Enzymlösung auf eine Säule, die mit Con A-Sepharose gefüllt war, gegeben. Die Säule wurde solange mit Startpuffer gespült, bis der erste große Peak eluiert war. Dann wurde dem Puffer Methyl- α -D-Glucopyranosid (0,05 M) zugegeben und so die an Con A gebundenen Proteine eluiert. In der Abbildung 3 ist ein typisches Chromatogramm gezeigt. Durch die Messung der Enzymaktivitäten war es kein Problem zu identifizieren, welche Enzyme die beiden Peaks repräsentieren.

Der Anteil, der nicht an Con A gebunden wurde, enthielt N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase. α -D-Mannosidase wurde dagegen an Con A gebunden und konnte mit Hilfe von Methyl- α -D-Glucopyranosid eluiert werden.

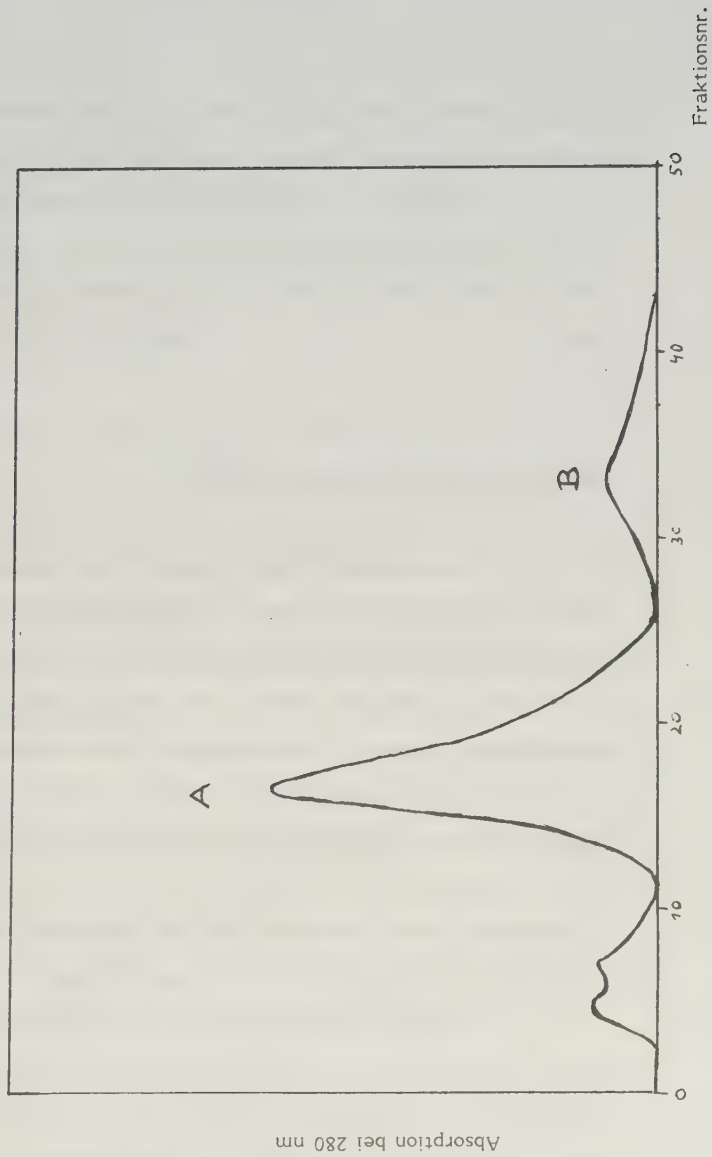
Abbildung 3: Reinigung von Glykosidasen an Con A-Sepharose

Die Absorption der Proteine wurde bei 280 nm gemessen.

10 ml Fraktionen wurden gesammelt.

Peak A: N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase

Peak B: α -D-Mannosidase



Da es sich gezeigt hatte, daß es schwierig ist, eine Isolierungsmethode zu finden, die für alle vorhandenen Glykosidasen optimal ist, wurde versucht, die Ausbeuten an N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase und α -D-Mannosidase möglichst effektiv zu gestalten. Deswegen wurden die restlichen fünf Enzyme vernachlässigt. Normalerweise wurden 80 - 90 % der angegebenen Enzymaktivitäten wiedererhalten.

5.2. Chromatographie an DEAE-Sephadex

Diäthylaminoäthyl-Sephadex (DEAE-Sephadex) ist ein Anionenaustauscher. DEAE-Sephadex trägt positive Ladungen mit normalerweise Chlorid als Gegenion. Das negativ geladene Chloridion kann durch andere negativ geladene Substanzen verdrängt werden, die dann aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen am Austauscher selbst hängenbleiben. Diese jedoch können wiederum vom Austausch eluiert werden, indem entweder der pH-Wert des Puffers in den sauren Bereich verschoben wird oder aber die Salzkonzentration des Puffers so erhöht wird, daß die gebundene Substanz selbst wieder verdrängt wird.

Dieses Prinzip wurde zur weiteren Reinigung der Glykosidasen, speziell α -D-Mannosidase und N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase angewandt.

Es zeigte sich, daß α -D-Mannosidase dann an DEAE-Sephadex gebunden werden konnte, wenn als Puffer eine 0,05 M Natriumphosphatlösung, pH 7,0 diente. Unter diesen Bedingungen wurde N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase nicht gebunden, sie erscheint mit dem Ausschlußvolumen. Um die gebundene α -D-Mannosidase eluieren zu können, mußte von Phosphatpuffer auf 0,05 M Natriumcitratpuffer, pH 6,0, gewech-

selt werden, dem NaCl (Konzentration: 0,05 M) zugesetzt war. Ein typisches Elutionschromatogramm ist in der Abbildung 4 gezeigt. Die Ausbeuten beider Enzyme betrugen rund 20 %.

5.3. Chromatographie an CM-Sephadex

Carboxymethyl-Sephadex (CM-Sephadex) ist im Gegensatz zu DEAE-Sephadex ein Kationenaustauscher. Positiv geladene Proteine können von CM-Sephadex festgehalten werden. Die Elution geschieht entweder wie bei DEAE-Sephadex mit hohen Salzkonzentrationen oder durch Erhöhung des pH's ins Alkalische.

Zur weiteren Reinigung von N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase wurden die nach der Con A-Sepharose erhaltenen Fraktionen mit N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase Aktivität über Nacht gegen Natriumcitrat Puffer (0,05 M, pH 4,5) dialysiert und anschließend auf eine mit CM-Sephadex gefüllte Säule gegeben. Obwohl die Wechselwirkung des Enzyms mit dem Kationenaustauscher nicht stark war, wurde es doch so weit retardiert, daß ein Reinigungseffekt erzielt werden konnte. Wie das Chromatogramm (Abbildung 5) zeigt, kann mindestens eine Proteinverunreinigung entfernt werden. Aufgrund der Aktivitätsmessung wurde der erste große Peak als N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase identifiziert. Die Fraktionen, die durch den schwarzen Balken angedeutet sind, wurden gesammelt. Der Ausbeuteverlust lag unter 10 %.

Abbildung 4: Reinigung von Glykosidasen an DEAE-Sephadex (α -D-Mannosidase)

Die Absorption der Proteine wurde bei 280 nm gemessen. 20 ml Fraktionen wurden gesammelt.

Peak A: N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase (ab und zu war dieser Peak mit etwas α -D-Mannosidase verunreinigt)

Peak B: ohne Glykosidase Aktivität

Peak C: α -D-Mannosidase

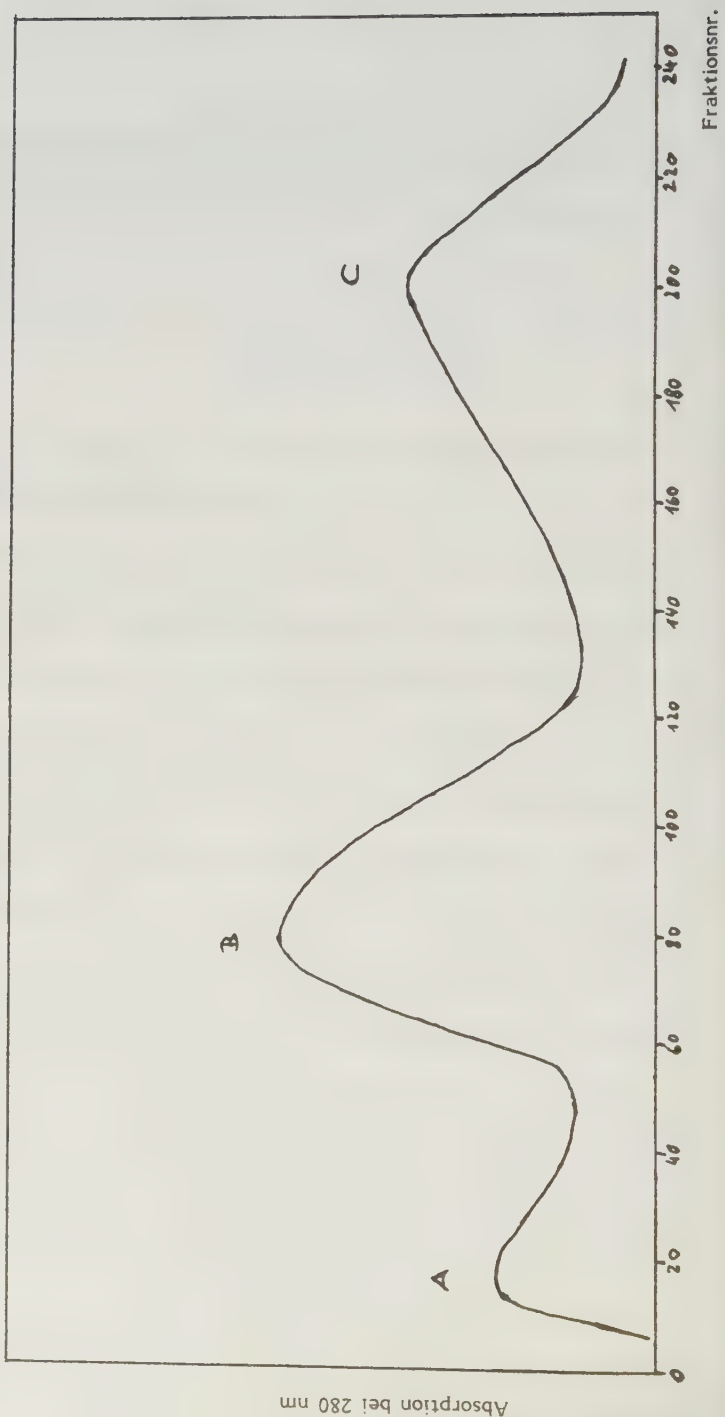
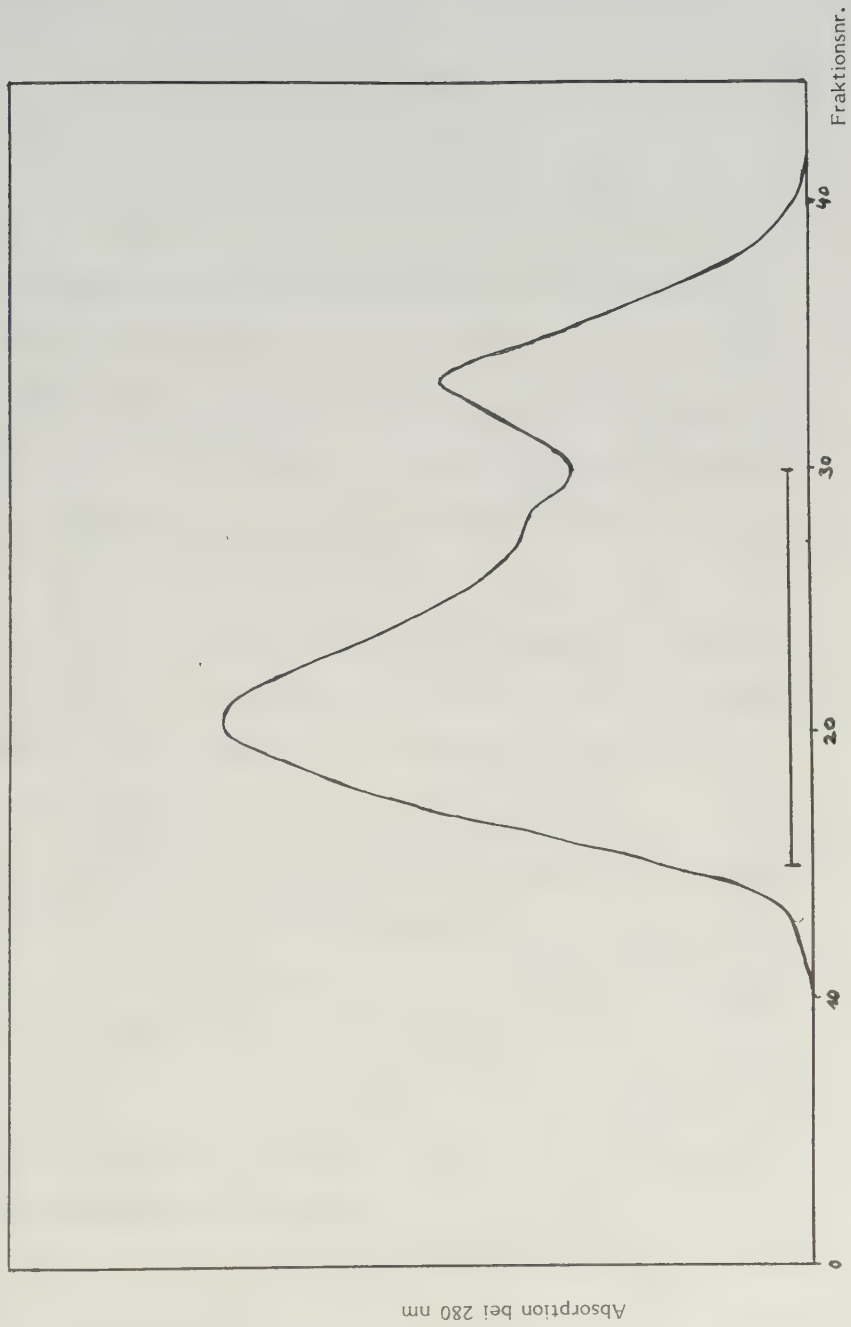


Abbildung 5: Reinigung von Glykosidasen an CM-Sephadex (N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase)
Die Absorption der Proteine wurde bei 280 nm gemessen. 20 ml Fraktionen wurden gesammelt.



5.4. Chromatographie an dem Molekularsieb G-100

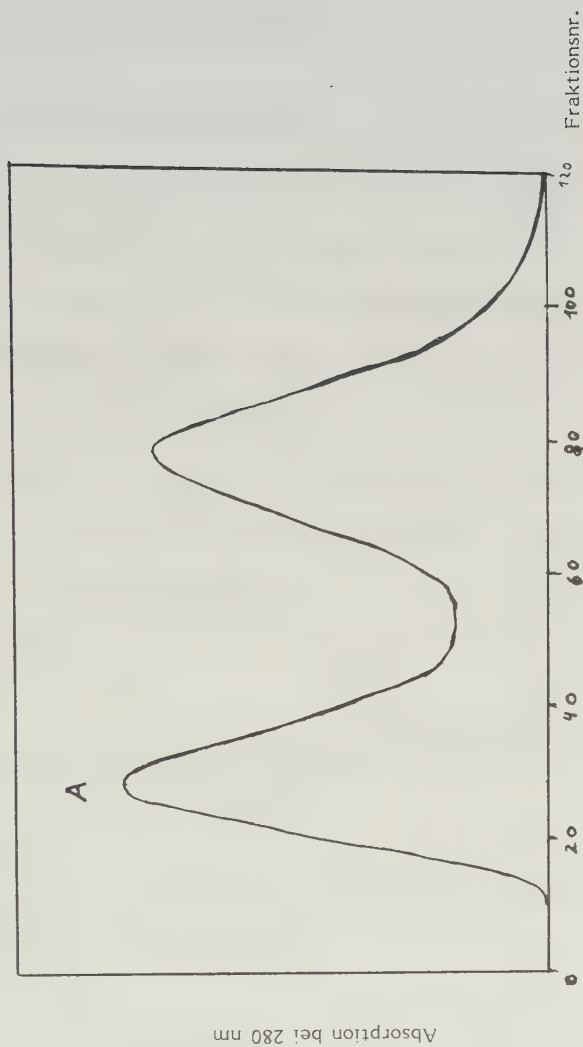
Mit Hilfe von Sephadex G-100 lassen sich Proteine nach ihrer Größe bzw. Molekulargewicht trennen. Der Trennbereich von G-100 erstreckt sich von 4000 D bis 150 000 D. Dies gilt aber nur, wenn globuläre Proteine vorliegen. Weiterhin gilt dieser Trennbereich nicht vollständig, wenn die globulären Proteine glykosiliert sind. Glykoproteine wechselwirken mit ihrem Carbohydratanteil mit der Matrix des Trennmateri- als. Da dies eine negative Wechselwirkung ist, passieren Glykoproteine das Gelbett schneller.

Gelfiltration an Sephadex G-100 wurde für die beiden Enzyme als letzter Reinigungsschritt durchgeführt. Da die Enzyme dazu eingesetzt werden sollen, aus HI-30 oder aus carbohydrathaltigen Peptiden, die aus HI-30 durch proteolytische Verdauung gewonnen wurden, Monosaccharide freizusetzen, war es besonders wichtig, Präparationen zu erhalten, die von keinen kleineren Molekülen verunreinigt waren.

Die aus dem bisherigen Reinigungsweg erhaltenen Enzymlösungen wurden auf eine rund 2 m lange Säule, die mit Sephadex G-100 gefüllt war, gegeben und mit Natrium-Citrat-Puffer (0,05 M, pH 4,5) eluiert. In der Abbildung 6 ist der Lauf für N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase gezeigt. Neben dem N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase Peak (Peak A) wurde ein weiterer großer Peak (Peak B) eluiert, der inaktiv war.

Wurde α -D-Mannosidase auf das Molekularsieb Sephadex G-100 gegeben, so wurde das gleiche Elutionsprofil erhalten. Zwei große Peaks, von denen nur der erste aktiv war. Da das Chromatogramm dem von N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase sehr ähnlich ist, kann auf eine Abbildung verzichtet werden.

Abbildung 6: Reinigung von N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase an G-100
Die Absorption der Proteine wurde bei 280 nm gemessen.
20 ml Fraktionen wurden gesammelt.



5.5. Zusammenfassung der Reinigungsschritte

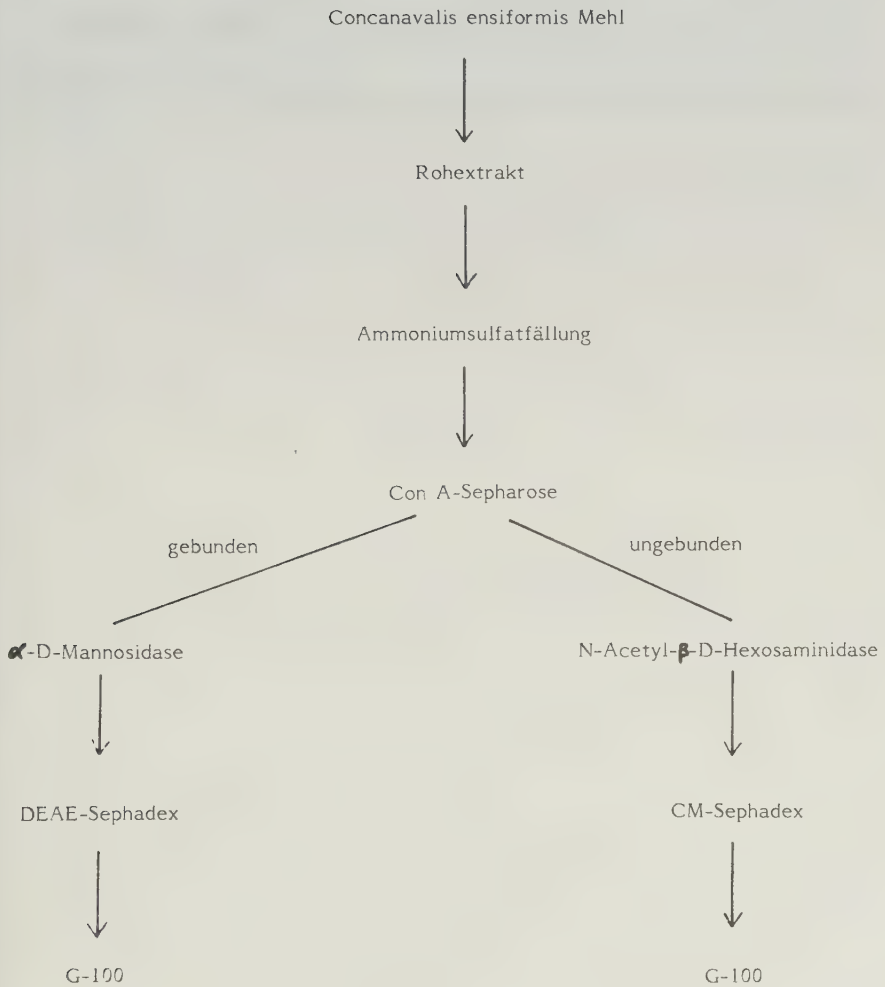
Nach vielen unterschiedlichen Versuchen und verschiedenen Kombinationen der chromatographischen Schritte, hat sich das beschriebene Verfahren, das im Schema nochmals zusammengefaßt ist, als geeignet erwiesen. Die Ausbeute betrug ca. 10 % der Anfangsaktivität im Rohextrakt. Dies gilt für α -D-Mannosidase und N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase. Da diese beiden Enzyme die größte Aktivität im Rohextrakt hatten, wurde deren Isolierung bevorzugt. Außerdem waren es die für die weiteren geplanten und durchgeführten Untersuchungen nötigen Enzyme.

Bei der Reinigung erwiesen sich die Ammoniumsulfatfällung und die Chromatographie an Con A-Sephrose am effektivsten. Für die ersten Versuche zur Abspaltung von Zuckern aus HI-30 bzw. Glykopeptiden daraus wurden die Ionenaustauscherchromatographien an DEAE-Sephadex und CM-Sephadex übersprungen. Es schloß sich der Sephadex G-100 Lauf direkt an den Con A-Sephrose Lauf an.

Obwohl eine gute Reinigung von α -D-Mannosidase und N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase erzielt werden konnte, hatten die chromatographischen Reinigungsschritte einen Nachteil. Als Basis der Sephadex-Gele bzw. Sepharose-Gele dient Dextran oder Agarose. Dextran und Agarose sind aus Zuckern aufgebaut und können somit als Substrate dienen. Auf diese Weise besteht die Gefahr, daß Artefacte während der Reinigung eingeführt werden.

Häufig hatten wir auch den Eindruck, daß weniger der Ligand, der kovalent ans Harz gebunden war (DEAE, CM, Con A), als vielmehr Dextran bzw. Agarose für den Trennungserfolg verantwortlich waren.

Schema der Glykosidasenreinigung



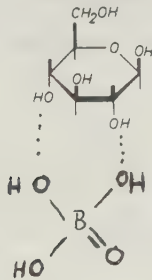
Was entscheidend war - Ligand oder Trennmatrix - kann dahingestellt bleiben. Die Ergebnisse, die erzielt wurden, waren reproduzierbar. Die erhaltenen Enzyme waren für weitere Versuche sauber genug. Weder in der α -D-Mannosidase Präparation, noch in der N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase Präparation konnten Fremdaktivitäten nachgewiesen werden.

6. Untersuchungen mit dem Zuckeranalysator

6.1. Prinzip der Methode

Die Analyse von Monosaccharidgemischen wurde flüssigkeitschromatographisch durchgeführt.

Zuerst müssen die Zucker mit Borationen komplexiert werden. Die Borationen gehen elektrostatische Wechselwirkungen mit den Hydroxylgruppen der Zucker ein.



Da die OH-Gruppen der einzelnen Zucker sterisch unterschiedlich zueinander stehen, ist die Komplexbildungsstärke unterschiedlich. Die Zucker-Borat-Komplexe, die alle negativ geladen sind, werden an einem Anionenaustauscharz aufgetrennt. Als Laufmittel diene ebenfalls Borat-Puffer mit unterschiedlichen Ionenstärken, zuerst 0,2 M Borat-Puffer, pH = 2,2, dann 0,4 M Borat-Puffer, pH = 4,5. Der Vorteil von Borat-Puffern ist zweifach. Einmal können die Proben ohne Vorbehandlung, sogar

wenn sie in saurem Medium gelöst sind, aufgegeben werden. Die Komplexbildung erfolgt automatisch. Zum zweiten werden die Komplexe nicht "gestört". Es sind immer Borationen im Überschuß vorhanden.

Die Zucker können wie erwähnt mit höherer Borat-Pufferkonzentration vom Anionenaustauschharz eluiert werden und werden dann mit Cu^{2+} /Neocuproin Reagenz nachgewiesen (Bedienungsanleitung des Indexanalysators CC 2000 Biotronic). In der Abbildung 7 ist das Chromatogramm eines Standards gezeigt. Die acetylierten Zucker werden nicht von Borationen komplexiert und werden deswegen nicht an der Säule retardiert, sondern kommen mit der Front. Acetylierte Aminozucker lassen sich jedoch eindeutig mittels eines Aminosäureanalysators nachweisen. Nach den Acetylaminozuckern wurde Mannose, dann als breiter Peak Fucose und anschließend Galaktose und Glucose eluiert.

6.2. Zuckeranteil des Glykopeptids

6.2.1. Isolierung des Glykopeptids

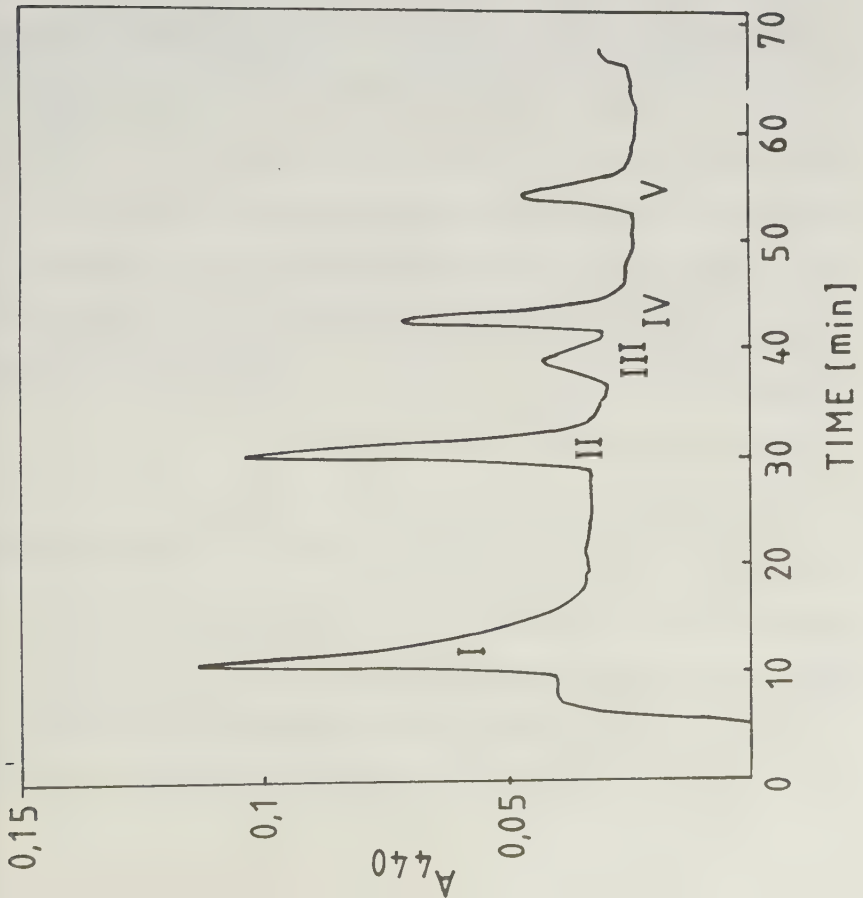
HI-30 hat zwei Aminosäure-Positionen, an denen Polysaccharidketten angeknüpft sind. Es sind dies Ser-10 (O-glykosidische Bindung) und Asn-45 (N-glykosidisch). Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde nur das Ser-Glykopeptid untersucht.

Die Isolierung dieses Peptids ist relativ einfach. HI-30 wird reduziert und carboxymethyliert und anschließend mit Trypsin, nachdem die Lysine durch Citraconylierung geschützt worden sind, verdaut. Die Isolierung des Peptides ist durch einfache Gel-filtration am Sephadex G-100 (32) möglich, da das Peptid in Folge des hohen Kohlenhydratanteiles die Säule mit dem Ausschlußvolumen passiert.

Abbildung 7: Chromatogramm des Zuckerstandards

Aufgegeben wurden je 25 nMol.

Peak	I	:	N-Acetylgalaktosamin
Peak	II	:	Mannose
Peak	III	:	Fucose
Peak	IV	:	Galaktose
Peak	V	:	Glucose



Das Glykopeptid hat folgende Aminosäuresequenz:



6.2.2. Polysaccharidanteil des Glykopeptids

Um den Gesamtzuckeranteil des Glykopeptids zu bestimmen, muß das Peptid hydrolysiert werden. Da die glycosidischen Bindungen gegen Säure labil sind, genügt eine kurze Hydrolyse mit 1-M Schwefelsäure. Es müssen jedoch verschieden lange Hydrolysezeiten untersucht werden, da Monosaccharide durch Säure abgebaut werden können. Das erhaltene Hydrolysat ist zu sauer, um es direkt auf den Zuckeranalysator zu geben. Zur Neutralisation bieten sich zwei Möglichkeiten an. Die Sulfationen kann man mit Bariumhydroxid-Lösung ausfällen. Dabei wird neben der Entfernung der Sulfationen auch die Lösung neutralisiert. Der Nachteil dieser Methode ist die große Flüssigkeitsmenge, die erhalten wird. Beim Einengen fällt wieder Bariumsulfat aus und durch Mitfällung von Zuckern wird das Ergebnis verfälscht. Vorversuche haben gezeigt, daß die Ergebnisse nicht zu reproduzieren waren. Die Neutralisation des Hydrolysats läßt sich auch mit einem anionischen Dowex-Ionenaustauscher in Carbonatform durchführen. Durch die Verwendung der Carbonatform wird erreicht, daß der Endpunkt der Neutralisation durch das Ende der Blasenbildung (CO_2 -Freisetzung) gut angezeigt wird. Zusätzlich werden Peptide und Aminosäuren aus der Lösung entfernt. Diese Methode hat jedoch zwei Nachteile. Wird das Harz ungequollen dazugegeben, können Zucker bei der unvermeidlichen Quellung des Harzes an Dowex absorbiert werden. Läßt man das Harz vorher quellen, erhält man wieder zuviel Flüssigkeit.

Nachdem die erwähnten Neutralisationsmethoden zu keinem befriedigenden Ergebnis geführt haben, wurde die Hydrolyse-Methode geändert. Statt Schwefelsäure wurde ein kationischer Dowex-Austauscher in H^+ -Form als unlösliche Säure zur Hydrolyse benutzt. Diese Methode führte auch nicht zum gewünschten Erfolg. Die Analyse des Hydrolysates mit dem Zuckeranalysator zeigte, daß mit dem Cu^{2+} /Neocuproin Reagenz zuviele Substanzen dedectiert werden konnten, die offensichtlich von Dowex-Austauscher stammten.

Durch Modifizierung der Schwefelsäuremethode gelang es, die Monosaccharide befriedigend zu bestimmen. Wird anstatt 1-M Schwefelsäure nur 0,05 M Schwefelsäure genommen, aber die Hydrolysezeit erhöht, läßt sich die Probe, da sie noch vom Borat-Puffer neutralisiert und alkalisch gemacht werden kann, direkt in den Zuckeranalysator geben.

Folgende Zuckerzusammensetzung wurde ermittelt: 2 Sialinsäure (die Bestimmungsmethode für Sialinsäure wird später beschrieben), 48 Acetylgalaktosamine, 18 Galaktose- und 2 Glukosereste.

6.3. Versuche zur Ermittlung der Monosaccharidsequenz des Glykopeptids

6.3.1. Abspaltung der Sialinsäure

Damit die isolierten bzw. angereicherten Glykosidasen Monosaccharide vom Glykopeptid abspalten können, mußte zunächst die immer endständige Sialinsäure, ent-

fernt werden, damit die Glukosidase freien Zugang zur Glukosidbindung ihrer Spezifität hat. Dazu wurde das Glykopeptid (10 mg) mit Neuraminidase (0,15 mg) 21 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz an einem Molekularsieb - Sephadex G-150 - aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden nach Aufgeben auf eine Dünnschichtplatte mit Ninhydrin als Detektionsmittel untersucht. Eine Blaufärbung zeigt das Vorhandensein des Glykopeptids an.

Die Ninhydrin-positiven Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Das so erhaltene Peptid (Asialopeptid) enthielt keine Sialinsäure mehr. Vielmehr konnte die Sialinsäure deutlich vom Asialopeptid abgetrennt im Eluat des Sephadex G-150 Laufes nachgewiesen werden. Die Identifizierung wurde nach der Methode von Aminoff (98) durchgeführt, bei der zunächst die Sialinsäure mit Perjodat oxidiert wird und anschließend mit Thiobarbitursäure zu einem rötlichen Komplex zusammengefügt wird.

Um sicher zu gehen, daß das Asialopeptid tatsächlich vollkommen frei von Sialinsäure ist, wurden 0,25 mg bei 80° C in 0,1 M Schwefelsäure 1 Stunde hydrolysiert. Dabei wird, falls vorhanden, Sialinsäure frei, die sich dann nach Aminoff nachweisen läßt. Es konnte keine Sialinsäure nachgewiesen werden. Damit ist gezeigt, daß die Abspaltung der Sialinsäure durch Neuraminidase vollständig verlaufen ist.

6.3.2. Umsetzung des Asialopeptids mit N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase

Das oben beschriebene Asialopeptid wurde über Nacht mit 200 mU N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase inkubiert und anschließend wieder an Sephadex G-150 aufgetrennt.

Da wegen fehlendem Tryptophan in dem Peptid keine Absorption bei 280 nm gemessen werden kann, wurde die Identifikation wieder mit Ninhydrin durchgeführt. Falls Zucker abgespalten wurde, sollte dieser nach dem Peptid eluiert worden sein. Deswegen wurden die Fraktionen, in denen **kein** Peptid mehr nachzuweisen war, vereinigt und getrocknet. Dann wurden die Proben in Boratpuffer gelöst und mit einem Zuckeranalysator analysiert.

Bezogen auf die Summenanalyse der Polysaccharidseitenkette, konnten mit der isolierten N-acetyl- β -Hexosaminidase mit Sicherheit nur 2 N-acetyl-galactosaminreste abgespalten werden. Dies würde bedeuten, daß die hauptsächlich aus N-acetyl-galactosamineinheiten bestehende Seitenkette bereits kurz nach Beginn der Kette durch Galactose oder Glucosereste unterbrochen ist. Dies macht es notwendig, Glucosidasen anderer Spezifität zu finden und auf ihre Brauchbarkeit zur Sequenzanalyse zu prüfen. Diese Untersuchungen sind noch im Gange.

7. Zusammenfassung

Zur Aufklärung der Struktur der Polysaccharidseitenketten des säurestabilen Trypsininhibitors des Urins und Plasmas (HI-30) wurden zwei Glykosidasen gereinigt.

Es waren dies α -D-Mannosidase und N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase. Als Ausgangsprodukt für die Isolierung dieser Enzyme diente das Mehl von *Concanavalia ensiformis*. Durch verschiedene Ausfällungs- und Chromatographieschritte konnten die Enzyme rein erhalten werden und für weitere Versuche eingesetzt werden. Die Reinigungsschritte wurden in Anlehnung an Li und Li (98) durchgeführt.

Da die Polysaccharidsequenzieranalytik während der Zeit, in der diese Arbeit angefertigt wurde, noch im Aufbau war, wurden Versuche durchgeführt, die dazu dienten, eine genaue, reproduzierbare Methode zu entwickeln, um eine Summenanalyse des Polysaccharidanteils von HI-30 zu erhalten.

Zur Strukturaufklärung der Polysaccharidseitenketten wurden die gereinigten Enzyme eingesetzt. Es zeigte sich jedoch, daß die isolierten Glucosidasen eine sehr hohe Spezifität hatten und deshalb nur mit N-acetyl-Hexosaminidase 2 N-acetylgalactosaminreste abgespalten werden konnten. Dies deutet auf das Vorliegen einer komplizierten bisher nicht bekannten Struktur der Seitenkette hin.

8. Literaturverzeichnis

1. Clamp, J. R. (1975) in "The Plasma Proteins, Structure, Function and Genetic Control" 2. Ausgabe, Frank W. Putnam, Herausgeber, Volume II, Academic Press, New York, S. 177-179
2. Schwick, H. G., Heide, K., and Haupt, H. (1977) in "The Glycoconjugates, Volume I, Mammalian Glycoproteins and Glycolipids" Martin I. Horowitz and Ward Pigman, Herausgeber, Academic Press, New York, S. 261-321
3. Morell, A. G., Gregoriadis, G., Scheinberg, I. H., Hickman, J. and Ashwell, G. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1461-1467
4. Ashwell, G. (1974) Biochem. Soc. Symp. 40, 117
5. Morell, A. G., Irvine, R. A., Sternlieb, I., Scheinberg, I. H. and Ashwell, G. (1968) J. Biol. Chem. 243, 155-
6. Van den Hamer, C. J. A., Morell, A. G., Scheinberg, I. H., Hickman, J., and Ashwell, G. (1970) J. Biol. Chem., 245, 4397
7. Gregoriadis, G., Morell, A. G., Sternlieb, I., and Scheinberg, I. H. (1970) J. Biol. Chem. 245, 5833-
8. Winterburn, P. J. and Phelps, C. F. (1972) Nature, 236, 147-151
9. Bernard, B. A., Yamada, K. M., and Olden, K. (1982) J. Biol. Chem. 257, 8549-8554
10. Olden, K., Pratt, R. M., and Yamada, K. M. (1978) Cell, 13, 461-463

11. Prives, J. M. and Olden, K. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5263-5267
12. Trowbridge, I. S., Hyman, R., and Mazouskas, C. (1978) *Cell*, 14, 21-32
13. Smith, F. and Unrau, A. A. (1959) *Chem. Ind. (London)* 78, 881-
14. Finne, J., Krusius, T. and Rauvala, H. (1980) *Carbohydr. Res.* 80, 336-339
- 14.a. Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y and Montreuil, J. (1981) *Anal. Biochem.* 116, 486-502
15. Reddy, M. S., Levine, M.J., and Tabak, L. A. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 882-888
16. Paz-Parent, J., Strecker, G., Leroy, Y., Montreuil, J., Fournet, B., van Halbeck, H., Dorland, L. and Vliegenthart, J. F. G. (1983) *FEBS-Letters* 152, 145-152
17. Nishigaki, M., Muramatsu, T., and Kobata, A. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59, 638-
18. Tarentino, A. L. and Maley, F. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 811-
19. Li, Y.-T. and Li, S.-C. (1977) in "The Glycoconjugates, Volume I Mammalian Glycoproteins and Glycolipids" Martin I. Horowitz and Ward Pigman, Herausgeber, Academic Press, New York, S. 51-67
20. Heimbürger, N. (1974) in "Proteinase Inhibitors. Proc. 2nd. Int. Research Conference-Bayer Symposium V (Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L. J. and Truscheit, E. Herausgeber) S. 14-22, Springer Verlag, Berlin

21. Travis, J. and Salvesen, G. S. (1983) *Ann. Rev. Biochem.* 52, 655-709
22. Carrell, R. W., Jeppson, J. O., Laurell, C. B., Brennan, S. O., Oween, N. C. et al. (1982) *Nature* 298, 329-334
23. Kurachi, K., Chandra, T., Degen, S. J. F., White, T. T., Marchioro, T. L., Woo, S. L., and Davir, E. W. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6826-6830
24. Carell, R. W., Jeppson, J. O., Vaughan, L., Brennan, S. O., Owen, M. C., Boswell, D. R. (1981) *FEBS-Letters* 135, 301-303
25. Hodges, L. C., Chan, S. K. (1982) *Biochemistry* 21, 2805-2810
26. Travis, J., Garner, D., Bowen, J. (1978) *Biochemistry* 17, 5647-5650
27. Peterson, T. E., Dudek-Wojciechowska, G., Scottrup-Jensen, L. and Magnusson, S. (1979) in "The Physiological Inhibitors of Blood Coagulation and Fibrinolysis" (Collen, D., Wiman, B. and Verstraete, M. Herausgeber) Elsevier, Amsterdam S. 43-54
28. Chandra, T., Stackhouse, R., Kidd, V. J., and Woo, S. L. C. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1845-1848
29. Wachter, E. and Hochstraßer, K. (1981) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 362, 1351-1355
30. Reisinger, P., Hochstraßer, K., Albrecht, G. J., Lempart, K. and Salier, J.-P. (1985) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366, 479-483

31. Morii, M. and Travis, J. (1985) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366, 9-14
32. Hochstraßer, K., Schönberger, O. L., Rossmanith, I. and Wachter, E. (1981)
Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 362, 1357-1362
33. Sottrup-Jensen, L., Stepanik, T. M., Jones, C. M., Petersen, T. E.,
Magnusson, S. (1979) in "The Physiological Inhibitors of Blood Coagulation
and Fibrinolysis" (Collen, D., Wiman, B., and Verstraete, M. Herausgeber)
Elsevier, Amsterdam S. 255-272
34. Kan, C.-C., Solomon, E., Belt, K. T., Chain, A. C., Hiorns, L. R., and Fey,
G. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 2282-2286
35. Brzin, J., Popovic, T., Turk, V., Borchart, U. and Machleidt, W. (1984) *Bio-
chem. Biophys. Res. Commun.* 118, 103-
36. Ohkubo, I. Kurachi, K., Takasawa, T., Shiokawa, H., and Sasaki, M. (1984)
Biochemistry 23, 5691-5697
37. Janoff, A. (1972) *Ann. Rev. Med.* 23, 177-189
38. Baugh, R., Travis, J. (1976) *Biochemistry* 15, 836-848
39. Laurell, C.-B. and Jeppson, J. O. (1975) in "The Plasma Proteins" (Putnam,
F.W. Herausgeber) Academic Press, New York 2. Ausgabe, Band 1, S. 229-
264
40. Matheson, N. R., Wong, P. S., Travis, J. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
88, 402-409

41. Satoh, S., Kurecki, T., Kress, L. F., and Laskowski, M. Sr. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86, 130-137
42. Gadek, J. E., Fells, G. A., and Crystal, R. G. (1979) *Science* 206, 1315-1316
43. Janoff, A., Carp, H. (1977) *Am. Rev. Respir. Dis.* 116, 65-72
44. Carp, H., Miller, F., Hoidal, J. R., and Janoff, A. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2041-2045
45. Reilly, C. F. and Travis, J. (1980) *Biochem. Biophys. Acta* 621, 147-157
46. Laurell, C. B. and Eriksson, S. (1963) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 15, 132-140
47. Mittman, C. (Herausgeber) (1972) "Pulmonary Emphysema and Proteolysis" Academic Press, New York
48. Straus, S. D., Fells, G. A., Wewers, M. D., Courtney, M., Tessier, L.-H., Tolstoshev, P., Lecocq, J.-P., and Crystal, R. G. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130, 1177-1184
49. Hochstraßer, K., Albrecht, G. J., Schönberger, O. L. and Wachter, E. (1983) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364, 1689-1696
50. Coombes J., Shakespeare, P. G., and Batstone, C. F. (1979) *Clin. Chim. Acta* 95, 201-209
51. Rosenberg, R. D. and Damus, P. S. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 6490-6505
52. Highsmith, R. F., Rosenberg, R. D. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 4335-4338

53. Lahire, B., Bagdasaridan, A., Mitchell, B., Talamo, R. C., Colman, R. W. and Rosenberg, R. D. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 175, 737-747
54. Kurachi, K., Fujikawa, K., Schmer, G. and Davie, E. W. (1976) Biochemistry 15, 373-377
55. Egeberg, O. (1965) Thromb. Diath. Haemorrh. 13, 516-530
56. Sas., G. Blasko, G., Bonhegyi, J., Jako, J., and Palos, A. (1974) Thromb. Diath. Haemorrh. 32, 105-115
57. Tran, T. H., Bounameaux, H., Bondeli, C., Honkamen, H., Marbet, G. A. und Duckert, F. (1980) Throb. Haemostasis, 44, 87-91
58. Schreiber, A. D., Kaplan, A. P., and Austen, K. F. (1973) J. Clin. Invest. 52, 1402-1409
59. Pickering, R. J., Kelly, J. R., Good, R. A. and Gewurz, H. (1969) Lancet 1, 326-330
60. Moroi, M. and Aoki, N. (1977) Biochem. Biophys. Acta, 482, 412-420
61. Wiman, B. and Collen, D. (1979) J. Biol. Chem. 259, 9291-9297
62. Wiman, B. (1981) Methods Enzymol. 80, 395-408
63. Edy, J., Collen D. (1977) Biochem. Biophys. Acta 484, 423-432
64. Starkey, P. M. and Barrett, A. J. (1977) in Proteinases in Mammalian Cells and Tissues (ed. A. J. Barrett) Elsevier/North Holland Biomedical, Amsterdam, pp. 661-691

65. Barrett, A.J. (1981) *Methods Enzymol.* 80, 737-754
66. Laurell, C. B. and Jeppson, J. O. 1975 in *Plasma Proteins, Structure, Function and Genetic Control* (Putnam, F. W. ed.) 2nd edition, Vol. 1, Academic Press, New York, pp. 229-264
67. Macartney, H. W. and Tschesche, H. (1983) *Eur. J. Biochem.* 130, 85-92
68. Macartney, H. W. and Tschesche, H. (1983) *Eur. J. Biochem.* 130, 93-97
69. Sasaki, M., Taniguchi, K., and Minakata, K. (1981) *J. Biochem. (Tokyo)* 89, 169
70. Lenney, J. F., Liao, J. R. Sugg, S. L., Gopalakrishnan, V., Wong, H. C. H., Ouye, K. H. and Chan, P. W. H. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108, 1581-1587
71. Brzin, J., Popovic, T., Turk, V., Borchart, U. and Machleidt, W. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118, 103-109
72. Sasaki, M., Minakata, K., Yamamoto, H., Niwa, M., Kato, T., and Ito, N. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76, 917-924
73. Ryley, H. C. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89, 871-878
74. Mort, J. S., Recklies, A. D. and Poole, R. (1980) *Biochem. Biophys. Acta* 614, 134-143
75. Ohkubo, I., Kurachi, K., Takasawa, T., Shiokawa, H., and Sasaki, M. (1984) *Biochemistry* 23, 5691-5697

76. Sueyoshi, T. Enjyoi, K.-I., Shimada, T., Kato, H., Iwanaga, S., Bando, Y., Kominami, E. and Katunuma, N. (1985) FEBS-Letters 182, 193-195
77. Müller-Esterl, W., Fritz, H., Machleidt, W., Ritonja, A., Brzin, J., Kotnik, M., Turk, V., Kellermann, J. and Lottspeich, F. (1985) FEBS-Letters 182, 310-314
78. Kornfeld, S. (1982) in "The Glycoconjugates, Volume III, Glycoproteins, Glycolipids, and Proteoglycans", Martin I. Horowitz, ed., Academic Press, New York, pp. 3-23
79. Beyer, T. A. and Hill, R. L. (1982) in "The Glycoconjugates, Volume III, Glycoproteins, Glycolipids, and Proteoglycans" Martin I. Horowitz, ed. Academic Press, New York, pp. 25-45
80. Steinbuch, M. (1976) Methods in Enzymol. 45, 760-772
81. Hochstraßer, K., Bretzel, G., Feuth, H. Hilla, W., and Lempart, K. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 153-162
82. Dietl, T., Dobrinski, W., and Hochstraßer, K. (1979) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1313-1318
83. Hochstraßer, K. and Wachter, E. (1979) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1285-1296
84. Wachter, E., Hochstraßer, K., Bretzel, G., and Heindl, S. (1979) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1297-1303
85. Wachter, E. and Hochstraßer, K. (1979) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1305-1311

86. Wachter, E. and Hochstraßer, K. (1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1351-1355
87. Hochstraßer, K., Albrecht, G. J., Schönberger, Ö. L., and Wachter, E. (1983) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1689-1696
88. Albrecht, G. J., Hochstraßer, K. and Schönberger, Ö. L. (1983) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1697-1702
89. Morii, M. and Travis, J. (1985) Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 366, 9-14
90. Reisinger, P., Hochstraßer, K., Albrecht, G. J., Lempart, K. and Salier, J.-P. (1985) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366, 479-483
91. Wilmes, E., Schönberger, Ö. L., Hochstraßer, K. (1979) Laryng. Rhinol. 58, 861-864
92. Chawla, R. J., Wadsworth, A. D., Rudman, D. (1978) J. Immunol. 121, 1636-1638
93. Mullins, D. E. and Rohrllich, S. T. (1983) Biochem. Biophys. Acta 695, 177-214
94. Rifkin, D. B., Moscatelli, D., Gross, J., and Jaffe, E. (1984) in Cancer Invasion and Metastasis: Biologic and Therapeutic Aspects (Nicolson, G. L. and Milas, L. eds.) Raven Press, New York, pp. 187-200
95. Hochstraßer, K., Feuth, H., Kempkes, B., Fall, J., Werle, E. (1974) Klin. Wschr. 52, 1018
96. "Affinitychromatography" Broschüre der Firma Pharmacia, Freiburg

97. Aminoff, D. (1961) *Biochem. J.* 81, 384

98. Li, Y.-T. and Li, S.-C. (1972) *Methods Enzymol.* XXVIII, 702-713

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hochstrasser, der mir die Arbeit in seinem Laboratorium ermöglichte und mir durch seine vielfältigen, auch kritischen, stets jedoch wertvollen Ratschläge und Anregungen immer hilfreich zur Seite stand.

Ebenso herzlich danke ich Herrn Dr. rer. nat. Öyvind Schönberger, der mit seiner geduldigen und vielseitigen Anleitung wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Frau Kathrin Lempert und Frau Ingrid Rosmanith gebührt mein herzlicher Dank für ihre zahlreichen hilfreichen Ratschläge bei der Durchführung der Laborarbeiten.

Herzlichst bedanke ich mich ebenso bei Frau Erika Bartl für ihre Mühe und Hilfe bei der Abschrift des Manuskriptes.

Lebenslauf

Am 10. Dezember 1942 wurde ich als zweiter Sohn des gefallenen Fluglehrers, Herbert Wollny, und seiner Ehefrau Auguste in Peiskretscham, Oberschlesien, geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Neubiberg und der Maria-Theresia-Oberrealschule in München absolvierte ich ab August 1959 eine dreijährige Lehre zum Chemielaboranten beim Technischen Überwachungs-Verein Bayern e.V. in München. Parallel hierzu besuchte ich die Abendlehrgänge der Städtischen Abendrealschule für Berufstätige und schloß diese mit der mittleren Reife ab. Vom April 1963 bis März 1965 erfolgte die Militärdienstzeit mit der Ausbildung zum Zugführer und Ernennung zum Leutnant am 1.1.1965. Ab April 1965 bis Oktober 1973 war ich als Sachverständiger für wasserchemische Probleme Angestellter des Technischen Überwachungs-Vereins Bayern e.V., und besuchte vom September 1970 bis Juli 1972 die abendlichen Oberstufenlehrgänge der Städtischen Abendrealschule für Berufstätige und schloß diese mit der Begabtenabiturprüfung im Fachgebiet Humanmedizin beim Bayerischen Ministerium für Unterricht und Kultus, im Januar 1973, ab. Im Winter 1973/74 nahm ich das Studium der Humanmedizin auf und beendete es mit der Ärztlichen Prüfung im April 1980 ab. Vom Januar bis Juni 1980 arbeitete ich am Biochemischen Forschungslaboratorium der HNO-Klinik der Universität München an meiner Dissertation. Seit April 1981 bin ich als praktischer Arzt in München niedergelassen.

